



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MAYRA TODESCHINI DE ASSUNÇÃO

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS T-REGULATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE
HEPATITE AUTOIMUNE COM INÍCIO DE APRESENTAÇÃO PEDIÁTRICA E EM
REMISSÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

CAMPINAS

2018

MAYRA TODESCHINI DE ASSUNÇÃO

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS T-REGULATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE
HEPATITE AUTOIMUNE COM INÍCIO DE APRESENTAÇÃO PEDIÁTRICA E EM
REMISSÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: Profa. Dra. MARIA ÂNGELA BELLOMO BRANDÃO

COORIENTADOR: Profa. Dra. ADRIANA GUT LOPES RICCETTO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO MAYRA TODESCHINI DE ASSUNÇÃO, E ORIENTADO PELO
PROFa. DRA. MARIA ANGELA BELLOMO BRANDÃO

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Assunção, Mayra Todeschini, 1983-
As79a Avaliação das células T-regulatórias em pacientes portadores de hepatite autoimune com início de apresentação pediátrica e em remissão clínica e laboratorial / Mayra Todeschini de Assunção. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Maria Angela Bellomo Brandão.
Coorientador: Adriana Gut Lopes Riccetto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hepatite autoimune. 2. Linfócitos T reguladores. I. Brandão, Maria Angela Bellomo, 1967-. II. Riccetto, Adriana Gut Lopes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of T-regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis with onset of paediatric presentation and in clinical and laboratory remission

Palavras-chave em inglês:

Autoimmune hepatitis

T-Lymphocytes, regulatory

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Maria Angela Bellomo Brandão [Orientador]

Irene Kazue Miura

Tiago Sevá Pereira

Data de defesa: 02-10-2018

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MAYRA TODESCHINI DE ASSUNÇÃO DUBRI PINHEIRO

ORIENTADOR: PROFA. DRA MARIA ANGELA BELLOMO BRANDÃO

COORIENTADOR: PROFA. DRA ADRIANA GUT LOPES RICCETTO

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARIA ANGELA BELLOMO BRANDÃO

2. PROFA. DRA. IRENE KAZUE MIURA

3. PROF. DR. TIAGO SEVA PEREIRA

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data: DATA DA DEFESA 02/10/2018

DEDICATÓRIA

Ao meu amor Antonio, por estar sempre ao meu lado, por me incentivar e me acalmar quando preciso. A você, dedico esta tese e todo meu amor!

Ao meu filho Pedro, minha alegria nesse último ano, por todos os sorrisos e amor que demonstra por mim todos os dias. Ao meu filho Lucas que ainda está no ventre, mas já é amado e esperado.

Aos meus pais, Célio e Martha, pelo constante incentivo ao estudo, por formarem a melhor família que eu poderia ter.

Aos meus irmãos, Cauê, Marcel e Renata, pelo conforto que sinto por saber que sempre terei os três ao meu lado. Às minhas cunhadas Camila e Nádia e meus sobrinhos Matheus e Leonardo por completarem nossa família!

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dra Angela, por todos os ensinamentos, por acreditar em mim e por me guiar tão bem nesse trabalho. Mais do que uma orientadora, uma amiga sempre disposta a ajudar. Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora Dra Adriana por confiar no meu potencial e por estar sempre por perto com observações pertinentes e auxiliando quando necessário.

Ao professor Marcos Nolasco pelo apoio, pela contribuição na análise estatística e por dividir conosco todo seu conhecimento como pesquisador.

Aos professores e assistentes da pediatria e gastropediatria da Unicamp, à vocês devo grande parte da minha formação.

À minha colega Irene, pelo auxílio na coleta de dados e pesquisa.

Aos meus amigos Vanesca e José Eduardo por estarem comigo nos muitos momentos de descontração nas aulas da pós-graduação.

À secretária da pós-graduação Márcia pela inestimável ajuda ao longo de todo o processo.

Aos pacientes participantes do estudo pelo altruísmo em colaborar com a minha pesquisa.

RESUMO

Introdução: a hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória e progressiva do parênquima hepático, cujas manifestações clínicas podem variar desde quadros oligossintomáticos até os de falência hepática aguda, especialmente quando não tratada adequadamente. Laboratorialmente, pode demonstrar alteração nos valores das transaminases, elevação dos níveis de gamaglobulinas e a presença de autoanticorpos. A sua patogênese não está completamente estabelecida, porém é possivelmente causada por gatilhos ambientais associados à falha de mecanismos imunológicos de tolerância, em indivíduos geneticamente susceptíveis nos quais o desarranjo do sistema imune é um ponto central a ser considerado. O processo de destruição dos hepatócitos na HAI envolve células dendríticas e natural killer (NK), linfócitos T e B, diferentes citocinas e possivelmente os próprios autoanticorpos. A todos estes eventos agressivos opõem-se as células T regulatórias (Treg), que exercem papel fundamental nos mecanismos de tolerância, estando envolvidas na supressão das células T autorreativas circulantes.

Objetivos: avaliar o número de células Treg em pacientes com HAI em terapia imunossupressora na faixa etária pediátrica.

Métodos: estudo de coorte analítico descritivo, realizado com 27 crianças e adolescentes com quadro clínico e laboratorial documentado de HAI de acordo com os critérios do Grupo Internacional de Estudo da HAI à época do diagnóstico, pareados com 25 pacientes controle sem comorbidades. Todos os pacientes do grupo caso apresentaram início de sintomas antes de 18 anos de idade, estavam em vigência de tratamento imunossupressor e foram classificados nos subtipos de hepatite autoimune – tipo 1, 2 ou indeterminado – de acordo com o perfil de autoanticorpos encontrados. Todos os sujeitos foram submetidos à coleta de amostra de sangue periférico para identificação de subtipos de linfócitos T, incluindo as células Treg, pelo método de citometria de fluxo; para análise das subpopulações de células, os resultados foram exibidos em porcentagem e comparados a população total de linfócitos.

Resultados: nas subpopulações estudadas das células T regulatórias (com marcadores de superfície TCD4/CD25+, TCD4/CD25/FOXP3+ e TCD4/CD25/FOXP3/CD39+) não foram observadas diferenças entre os grupos caso e controle.

Conclusão: como a maior parte dos pacientes desse estudo demonstrou boa resposta ao tratamento imunossupressor, é provável que o fato de não ter sido encontrado diferenças entre a porcentagem de Tregs nos dois grupos estudados seja devido a atividade inflamatória reduzida ou mesmo ausente. Pacientes pediátricos com HAI em terapia imunossupressora, que apresentem Treg em número normal provavelmente tem baixo nível de inflamação (ou possivelmente nenhum) e a utilização deste biomarcador pode ser um promissor dado objetivo na avaliação de remissão da doença.

PALAVRAS-CHAVE: HEPATITE AUTOIMUNE; LINFÓCITOS T REGULADORES.

ABSTRACT

Introduction: autoimmune hepatitis (AIH) is a progressive inflammatory disease of the liver, whose clinical manifestations can range from mildly symptomatic patients up to acute liver failure in improperly treated patients. Laboratory findings include elevation in serum liver enzymes and gamma globulin levels, besides autoantibodies positivity. Its pathogenesis is not completely understood, but probably involves triggering by environmental factors associated with the failure of immune tolerance mechanisms in genetically susceptible individuals, in whom derangement of the immune system plays a key role. The process of hepatocyte destruction is carried by different cell types - dendritic cells, natural killer cells, T and B lymphocytes, a wide range of cytokines and possibly the autoantibodies themselves. All these proinflammatory events are counterbalanced by the mechanisms of tolerance effected by regulatory T cells (Tregs), which are involved, for instance, in the suppression of circulating auto reactive T cells.

Objectives: to evaluate the number of Treg cells in patients with HAI in immunosuppressive therapy in the pediatric age group.

Methods: a descriptive analytical cohort study was carried out with 27 children and adolescents with documented clinical and laboratory findings compatible with autoimmune hepatitis according to the criteria of the International Study Group of HAI at the time of diagnosis. This case group was paired with 25 control patients without comorbidities. All patients in case group had the onset of symptoms before 18 years of age and they all were under immunosuppressive treatment. They were also classified, according to their autoantibody profile, in disease subtypes - 1, 2 or undetermined. All subjects underwent peripheral blood sample collection to identify T lymphocyte subsets, including Treg cells, by flow cytometry method. The analysis of the cell subpopulations' results were displayed in percentage and compared to the total lymphocitary population.

Results: no differences were observed between the two patient groups regarding the studied Treg cells subpopulations (with surface makers TCD4/CD25+, TCD4/CD25/FOXP3+ and TCD4/TCD25/FOXP3/CD39+).

Conclusion: since most of the patients in this study demonstrated good response to immunosuppressive treatment, it is likely the results showing no difference between the percentage of Treg cells in the two study groups were due to reduced, or even absent, inflammatory activity in AIH cases. Pediatric patients with autoimmune hepatitis under therapy who present regular number of Treg cells are likely to have low or possibly none inflammation and the use of this biomarker may be a promising data in the assessment of disease remission

KEYWORDS: AUTOIMMUNE HEPATITIS; T-LYMPHOCYTES REGULATORY.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Principais manifestações clínicas da Hepatite Autoimune tipos 1 e 2	20
Tabela 2	Características epidemiológicas e clínicas dos grupos caso e controle	33
Tabela 3	Autoanticorpos pesquisados para HAI no grupo caso, no momento do diagnóstico	34
Tabela 4	Características epidemiológicas e clínicas do grupo caso no momento da coleta de imunofenotipagem de linfócitos	35
Tabela 5	Análise de subtipos de linfócitos T por exame de citometria de fluxo dos grupos caso e controle	36
Tabela 6	Tabela para cálculo de escore diagnóstico HAI-1999	46
Tabela 7	Tabela para cálculo de escore diagnóstico HAI-2008	47
Quadro 1	Tipos de Hepatite Autoimune e as características dos autoanticorpos envolvidos	22
Quadro 2	Painel de marcadores de superfície para linfócitos T e T-reguladores	30
Quadro 3	Painel de anticorpos de marcação de superfície	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Difosfato de adenosina

ALT- Alanina aminotransferase

AMP - Adenosina monofosfato

ANA - Anticorpo antinuclear

Anti- SLA - antígeno solúvel do fígado

Anti-LKM - anticorpo anti microsomal fígado/rim tipo 1

ATP - Trifosfato de adenosina

BB - Brilliant Blue

BD - Becton Dickinson

C- Complemento

DC - Célula Dendrítica

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - **Ácido etilenodiamino tetra-acético**

ESPGHAN - Sociedade Européia de Gastreenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição

FALC fosfatase alcalina

FAN - Fator anti-núcleo

FoxP3 – Forkhead box 3

FSC - Forward Scatter

GGT - gamaglutamiltransferase

HAI - Hepatite autoimune

HCV- Virus da hepatite C

HIV - Vírus da imunodeficiência Humana

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

IAIHG - Grupo Internacional de Hepatite Autoimune

IFN - Interferon

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

NASPGHAN - Sociedade Norte Americana de Gastreenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição

NK - *Natural Killer*

PBS - Tampão fosfato salino

PMTs - Tubo fotomultiplicadores

Rpm - Rotação por minuto

SMA - Anticorpo anti-músculo

SSC- Feixe de luz

Th - Linfócitos T helper

TNF - Fator de necrose tumoral

Tregs – Células T reguladoras

V500 – Violeta

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	26
3. PACIENTES E MÉTODOS	26
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37
8. ANEXOS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e prevalência

A Hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória e progressiva do parênquima hepático, podendo apresentar-se nas formas aguda ou crônica e, quando não adequadamente tratada, leva a falência hepática¹. Desde a sua primeira descrição em 1950, a HAI já foi conhecida por uma grande variedade de termos: hepatite crônica ativa, hepatite crônica agressiva, hepatite lupóide e hepatite por plasmócitos^{2,3}. Define-se como “doença de causa inflamatória caracterizada histologicamente por denso infiltrado inflamatório no trato portal e sorologicamente, pela presença de auto-anticorpos específicos para o fígado, na ausência de outra etiologia conhecida e que apresenta resposta ao tratamento imunossupressor”, segundo Grupo internacional de HAI⁴.

A prevalência da HAI na faixa etária pediátrica não é conhecida; estima-se menos de um caso para cada 100.000 crianças¹. É responsável por 5-10% das doenças hepáticas na infância nos principais centros do país³. O sexo feminino é o mais acometido e há dois picos principais de incidência: na faixa etária pediátrica e entre adultos por volta dos 40 anos¹.

Assim, como em outros estudos de prevalência^{1,3} recente estudo brasileiro demonstrou maior prevalência de HAI tipo 1, que acometeu 89,6% dos pacientes; houve predominância do sexo feminino nos dois tipos de HAI, assim como demonstrado na literatura⁵.

1.2 Patogênese

A HAI é uma doença complexa, possivelmente causada por gatilhos ambientais associados à falha nos mecanismos imunológicos de tolerância, em indivíduos geneticamente susceptíveis⁶.

Apesar de não haver um consenso, muitos vírus, fármacos e plantas medicinais já foram aventados como possíveis gatilhos da HAI. Dentre eles os vírus das hepatites A, C e E, sarampo, Epstein Barr e Herpes; fármacos como minociclina, ácido telínico, nitrofurantoína, melatonina, diclofenaco e estatinas; além de plantas medicinais como a dai-taiko-so (comumente usada no Japão)⁷.

Os gatilhos parecem compartilhar epítomos semelhantes aos autoantígenos. O mimetismo molecular entre os autoantígenos e os ambientais é o mecanismo fisiopatológico mais frequentemente imputado na gênese da HAI tipo 2. A exposição repetida aos gatilhos antigênicos por sua vez pode induzir o dano autoimune direcionado ao órgão específico^{7,8}.

Apesar do mecanismo exato de rompimento da tolerância imunológica ao *self* na HAI não estar totalmente esclarecido, o desarranjo da regulação do sistema imune é provavelmente o ponto central a ser considerado. O conceito de tolerância ao *self* se baseia no fato de que indivíduos saudáveis apresentam células T auto reativas circulantes, assim como mecanismos imunológicos que limitam os danos teciduais autoimunes por elas provocadas, ou seja, mecanismos que estabelecem tolerância ao *self*⁹. Células T regulatórias (Tregs) exercem papel fundamental nestes mecanismos de tolerância, pois estão envolvidas na supressão das células T auto reativas circulantes⁹.

Em linhas gerais, na HAI, a agressão autoimune se dá por uma combinação complexa de eventos imunológicos, que resultam em lesão de hepatócitos e infiltrado inflamatório linfocitário nos espaços porta e periportal,^{7,9} A resposta imune na HAI se inicia quando um peptídeo (que atua como gatilho) se acopla à uma molécula HLA (antígeno leucocitário humano); este conjunto é apresentado ao linfócito TCD4 e linfócitos T helper (TH0) por uma célula do sistema imune inato, chamada célula apresentadora de antígeno (usualmente uma célula dendrítica)¹⁰. Após essa interação, as células TH0 diferenciam-se em células TCD4 (T- helper 1/TH1 e T-helper/TH2), que secretam citocinas inflamatórias (IL2 e interferon gama) e ativam macrófagos do tecido hepático. Os macrófagos ativados aumentam a expressão de HLA tipo 1 e induzem a expressão de HLA tipo 2 sobre os hepatócitos, tornando-os capazes de apresentar o autoantígeno à célula autoimune. A produção de autoanticorpos a partir de linfócitos B/ plasmócitos ativados é induzida por interleucinas IL4, IL5 e IL10 que foram produzidas pelas células TH2. Portanto, o processo de destruição dos hepatócitos na HAI envolve células dendríticas, linfócitos T e B, diferentes citocinas, autoanticorpos e outras células, como as células Natural killer (NK)^{7,9}. A todos estes eventos, se opõem as células Treg, que na HAI e em outras doenças autoimunes apresentam defeitos numéricos e funcionais, já descritos por diferentes autores¹¹. As células Treg desempenham papel fundamental na patônese dos distúrbios autoimunes já que atuam no controle da resposta imune efetora. O conhecimento sobre o número e funcionalidade dessas células pode ser a chave para futuras perspectivas de tratamento.

1.2.1 Células T reguladoras e HAI

As primeiras descrições das células Tregs¹² demonstraram que estas células são um subgrupo de Linfócitos T CD4 que expressam em sua superfície um receptor para IL2 chamado CD25 e tem potente efeito imunossupressor *in vivo* e *in vitro*. Além do CD25, as Treg, quando ativadas, expressam também outros marcadores, como o fator de transcrição FOXP3 e moléculas como CTLA-4, LAP, CD127 e CD39. O marcador CD39 (também chamado ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, ENTPD1) é uma enzima que degrada adenosine trifosfato (ATP) em adenosine monofosfato (AMP). Em humanos, o CD39 é expresso nas células Treg de memória⁹. A partir de uma perspectiva funcional e prática, os mecanismos de supressão das Tregs podem ser agrupados em quatro modos de ação: supressão pela modulação das células apresentadoras de antígeno, quanto a sua maturação e função; supressão pela morte de células alvo; supressão por interrupção do metabolismo de células T efectoras e supressão através da secreção de citocinas inibitórias, como TGFb e IL10⁹.

Algo ainda a ser esclarecido é se a quebra da tolerância imunológica aos autoantígenos hepáticos deve-se unicamente a um defeito numérico e/ou funcional nas células Treg já que defeitos de apoptose destas células também foram descritos na patogênese da HAI^{11,13}. Células Treg específicas para autoantígenos têm sido descritas em pacientes com hepatite autoimune tipo 2 e provavelmente atuam como guardiões de respostas imunes efectoras por meio do controle da proliferação, secreção de citocinas pró-inflamatórias. Elas provavelmente também controlam linfócitos B, uma vez que há forte correlação inversa entre o número de células Treg e títulos de auto anticorpos Anti-LKM1 (do inglês, *anti-liver kidney microsomal type 1 antibody*), na HAI tipo 2 e Anti-SLA (antígeno solúvel do fígado) no tipo 1^{7,11}. O desequilíbrio imunológico resultante por defeito da produção da célula T e hiperfunção do linfócito B e consequente estimulação policlonal dos linfócitos B são a causa relacionada a hipergamaglobulinemia, presente na maioria dos pacientes com HAI¹⁴.

1.3 Genética

HAI é uma doença com poligenicidade complexa e populações diferentes devem ter associações genéticas e gatilhos diferentes. A doença tem sido associada ao complexo

principal de histocompatibilidade II, e especificamente genes do HLA, incluindo HLA-DR3, HLA-DR4 e HLA-DRB13, porém muitos pontos mantêm-se obscuros nessa associação⁶.

Algumas variantes genéticas específicas ou polimorfismos podem aumentar o risco de desenvolver a doença, contudo a presença de uma mutação causadora da doença não causa a doença obrigatoriamente. Muitos polimorfismos provavelmente interagem para afetar o fenótipo clínico em um paciente com HAI, embora as evidências para esse tipo de interação existam apenas no tipo 1⁶.

1.4 Quadro clínico

O quadro clínico da doença é extremamente variável, mas há três formas principais de apresentação: em até 40% dos pacientes a apresentação é indistinguível de um quadro agudo de hepatite viral; 25-40% dos pacientes iniciam o quadro insidiosamente com sintomas inespecíficos como fadiga progressiva, cefaleia, perda de peso e icterícia flutuante que podem anteceder o diagnóstico em anos ou meses; e em aproximadamente 10% dos pacientes não há história pregressa de icterícia e o diagnóstico é feito pela presença de complicações de hipertensão portal. Os pacientes também podem ser assintomáticos, cursando apenas alterações laboratoriais ou apresentação de falência hepática fulminante¹. No Brasil, foi observado início do quadro como agudo em mais de 50% dos pacientes, tanto para HAI tipo 1 quanto tipo 2. Entretanto, a presença de insuficiência hepática foi mais frequente nos casos de HAI tipo 2, atingindo 10,6% dos pacientes⁵. A grande variedade de apresentações pode dificultar ou atrasar o diagnóstico da HAI, que deve ser considerada como diagnóstico diferencial em qualquer doença hepática¹⁵.

A presença de manifestações extra-hepáticas de autoimunidade pode estar presente no diagnóstico ou no decorrer da doença; incluem diabetes melito tipo 1, artrite, tireoidite, psoríase, doença inflamatória intestinal, anemia hemolítica, poliarterite nodosa e glomerulopatias. Estudo brasileiro demonstrou a prevalência de manifestações extra-hepáticas em 24,8% dos pacientes com HAI tipo 1 e 14,1% dos portadores do tipo 2. Em relação ao prognóstico, a taxa de sobrevivência atuarial foi de 93%; 4,6% dos pacientes necessitaram de transplante hepático e o óbito foi o desfecho em 6,9% dos casos⁵.

As principais manifestações clínicas da hepatite autoimune estão representadas na Tabela 1.

1.5 Exames laboratoriais

As enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) costumam mostrar aumento significativo, chegando a níveis maiores de 1.000UI. Os níveis de fosfatase alcalina (FALC), gamaglutamiltransferase (GGT) e bilirrubina na fração direta também costumam estar aumentados, exceto nas formas de apresentação insidiosa onde os valores podem estar normais ou parcialmente alterados. A albumina normalmente encontra-se diminuída e a hipergamaglobulinemia geralmente é acima de 2 g/dL. A doença também causa níveis diminuídos dos fatores do complemento C3 e C4¹⁷.

Tabela 1: Principais manifestações clínicas da Hepatite Autoimune tipo 1 e tipo 2 (Adaptado de Mieli Vergani ¹, presente em Santos IP¹⁶)

Manifestações clínicas	HAI 1	HAI 2
Sintomas agudos, semelhantes à hepatite viral: Apatia, fadiga, náusea/vômito, anorexia, dores articulares e abdominais. Icterícia/ colúria/acolia fecal	40 a 50%	50 a 60%
Encefalopatia hepática/ falência hepática - Duas semanas a dois meses do início dos sintomas.	3%	25%
Sintomas insidiosos: apatia, fadiga, icterícia intermitente, amenorreia, cefaleia, diarreia, perda de peso, dores articulares e abdominais. Início: seis meses a alguns anos antes do diagnóstico.	40%	25%
Cirrose. Hipertensão portal com varizes esofagianas, hematemese, esplenomegalia, sem história prévia de doença hepática	10%	
Refratariedade à interrupção do tratamento imunossupressor	HAI 2 > HAI 1	
Manifestações clínicas	HAI 1	HAI 2
Doença autoimune na família	40%	
Outras doenças autoimunes associadas Tireoidite/hipotireoidismo Doença inflamatória intestinal	5 a 23% 18%	

1.5.1 Autoanticorpos

O envolvimento dos autoanticorpos na patogênese da HAI não está claro. A maioria do conhecimento sobre o papel deles deriva de análises do Anti-LKM1 (anticorpo anti microsomal fígado/rim tipo 1, em inglês *anti-liver kidney microsomal type 1 antibody- anti-LKM-1*). A reação cruzada de Anti-LKM1 com regiões homólogas do citocromo CYP2D6 e do HCV (vírus da hepatite C) sugere uma infecção viral como um possível gatilho para a HAI tipo 2. No entanto não há uma demonstração convincente que confirme essa associação. Não está claro como os outros autoanticorpos são capazes de atingir antígenos intracelulares¹⁸.

A detecção de auto anticorpos é feita pela técnica de imunofluorescência indireta e é útil não apenas para o diagnóstico quanto para a classificação da doença. Entre os autoanticorpos detectáveis nos pacientes com HAI, destacam-se o ANA (do inglês *antinuclear antibody*, também conhecido por FAN – fator antinuclear), anticorpo antimúsculo liso (SMA do inglês *anti-smooth muscle antibody* ou AML) e anti-LKM1, os quais podem auxiliar na diferenciação dos subtipos da doença. Não está claro se os autoanticorpos contribuem substancialmente para a patogênese da HAI¹⁸.

O ANA ser detectado através de positividade nuclear no rim, estômago e fígado (de substrato de ratos), ou, atualmente, através de cultura de células epiteliais de carcinoma de laringe (células HEp-2). O alvo dos ANA na HAI tipo 1 inclui todas as estruturas da cromatina, como o DNA, centrômero e histonas, e o padrão da imunofluorescência pode ser variável, sendo que padrões como nuclear homogêneo, nuclear tipo membrana nuclear e citoplasmático fibrilar nuclear são os mais associados. Além do padrão, a titulação dos anticorpos também é importante ^{18,19}. A positividade do ANA não é específica da HAI e ele pode ser detectado também em hepatites virais, especialmente tipos B e C, doença hepática induzida por droga, esteatose hepática não-alcoólica¹⁸ e as outras doenças autoimunes não hepáticas ^{17,20}.

O SMA pode ser detectado no rim, estômago e fígado de rato, sendo o alvo específico a actina. No substrato renal é possível visualizar os padrões V (vessels), G (glomérulos) e T (túbulos). VG e VGT são os mais detectados na HAI. A ausência desse autoanticorpo não exclui o diagnóstico de HAI e, assim como o ANA, ele pode estar presente em hepatites virais e doenças autoimunes não hepáticas. ²⁰

A fração Anti-LKM1 está presente nas células do citoplasma hepático e nos túbulos renais do rato, e tem como alvo estrutura da família do citocromo P450 (CYP2D6). É um autoanticorpo muito específico para HAI tipo 2, mas pode ser encontrado numa pequena porção de pacientes cronicamente infectados pelo vírus C¹⁷.

Em pacientes com alta suspeição de HAI e com perfil típico de anticorpos negativos, outros anticorpos menos comuns podem ser solicitados, incluindo: anticorpos anticitoplasma de neutrófilos padrão perinuclear (pANCA), antiactina (anti-actin), anti-SLA, anti-receptor de asialoglicoproteína (anti-ASGPR), anticromatina, anti antígeno fígado-pâncreas (anti-LP) e anticorpo anticitosol hepático tipo 1 (LC-1) – este último intimamente ligado ao diagnóstico de HAI tipo 2¹⁸. O quadro 1 abaixo resume os principais dados dos autoanticorpos encontrados nesta entidade.

Quadro 1 – Tipos de Hepatite Autoimune e as características dos autoanticorpos envolvidos
(adaptada de Sebode 2018¹⁸)

Hepatite Autoimune	Autoanticorpo	Estrutura ou molécula alvo	Valor diagnóstico
HAI tipo 1	Antinuclear (ANA)	Cromatina	Sim, considerando padrão da IFI e titulação
	Antimúsculo liso (SMA)	Actina filamentosa; especificidade tubular e glomerular renal	Sim, considerando padrão imunohistoquímico
	Antimicrosomal de fígado e rim tipo 2 (LKM2)	Citocromo P450 2C9	Não, associado a doença hepática induzida por droga
	Antiantígeno solúvel do fígado (SLA)	Proteína supressora de t-RNA associada	Sim, associada a fenótipo grave
	Anticitoplasma de neutrófilos perinuclear (pANCA)	Isotipo 5 de beta-tubulina	Sim, compatível com a doença
HAI tipo 2	Antimicrosomal de fígado e rim tipo 1 (LKM1)	Citocromo P450 2D6	Sim, na exclusão de doença hepática por vírus C
	Anticitosol hepático tipo 1 (LC-1)	Formiminotransferase ciclodeaminase	Sim
	Antilipoproteína de membrana hepática (ASGPR)	Receptor de asialoglicoproteína	Sim, compatível com a doença

Makol et al⁶ em um artigo de revisão, afirma que 10 a 15% dos pacientes não apresentam ANA, SMA ou anti-LKM1 no início da doença, porém 25% destes apresentarão positividade para algum desses marcadores durante o acompanhamento. Similarmente, outros 10-20% dos pacientes pANCA ou anti-SLA, inicialmente negativos apresentarão soro conversão.

Aproximadamente 5% dos pacientes não apresentarão autoanticorpos positivos ao longo do curso da doença, esses pacientes possuem características clínicas semelhantes aos outros 2 grupos e respondem bem a terapia imunossupressora ¹⁷.

A despeito da pesquisa e positividade dos autoanticorpos na hepatite autoimune, não há evidência concreta que estes apresentem um efeito direto na patogênese da doença; contudo, eles devem contribuir, associado a outros mecanismos imunológicos, no processo de inflamação hepática crônica ¹⁸.

1.6 Achados histológicos

A biópsia hepática é necessária para o diagnóstico da HAI; além disso, nos traz informações sobre o grau de comprometimento hepático.

Os achados histológicos típicos incluem: infiltrado celular inflamatório com presença de plasmócitos, que ultrapassa o trato portal e atinge os hepatócitos no lóbulo hepático (denominado hepatite de interface); emperipoese e presença de rosetas de hepatócitos ²¹. A emperipoese é caracterizada pela presença de linfócitos, ou raramente plasmócitos, no citoplasma dos hepatócitos, ocorrendo em aproximadamente 70% dos casos de HAI. É mais comum na HAI do que em hepatites de outras etiologias, porém não é um achado patognomônico ²². Esta condição pode ser um outro mecanismo de lesão hepatocelular e induzir apoptose do hepatócito. A presença de emperipoese na biópsia está associada a níveis mais altos de transaminases, maior atividade necroinflamatória e fibrose. Já as rosetas de hepatócitos são uma indicação de regeneração da lesão celular e são definidas como um pequeno grupo de hepatócitos em volta de um lúmen central, às vezes não visível²¹. São encontradas em cerca de 50% dos casos e também são mais comuns na HAI do que em hepatites de outra etiologias²³. Em biópsias hepáticas de pacientes pediátricos a presença de rosetas é um importante marcador histológico, apesar de também não serem obrigatórias para o diagnóstico ⁴.

1.7 Critérios diagnósticos

Em 1992 um grupo de 27 especialistas com interesse na área de hepatologia reuniu-se e criou o Grupo Internacional de Hepatite Autoimune (*International Autoimmune Hepatitis Group* - *IAIHG*). Um ano após a criação, este cresceu e então, composto por 40 pesquisadores de 17 países, propôs a criação de um sistema de pontos para o diagnóstico de HAI, os quais foram posteriormente revisados em 1999, no intuito de diagnosticar indivíduos que não apresentassem todas as características clássicas. O escore classifica o paciente conforme a pontuação em provável ou não provável baseado em critérios positivos: sexo feminino, histologia hepática com características clássicas, níveis séricos

aumentados de AST e imunoglobulinas e a presença de auto anticorpos. A presença de hepatites virais ou outras causas de hepatite como drogas ou medicamentos diminuem a pontuação (Tabela 6 – anexo 1) ⁴. Devido sua complexidade (13 componentes e 29 graus possíveis de classificação), em 2008 foi criado um sistema de pontuação simplificado baseado (Tabela 7 – anexo 2) em apenas quatro componentes: autoanticorpos, concentração sérica de imunoglobulina G (IgG), histologia hepática e ausência de marcadores virais ^{15, 24, 25, 26}. Contudo, diversos artigos ^{8, 25, 27} vêm sendo publicados sobre os variados aspectos da HAI e sua sistematização diagnóstica, mas alguns pontos ainda permanecem em discussão.

Uma nova classificação vem sendo estudada, proposta no último consenso da *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition* and *North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition* – ESPGHAN e NASPGHAN ¹.

Assim, os critérios diagnósticos são fundamentados em uma combinação de achados clínicos, bioquímicos, imunológicos e histológicos, após exclusão de outras causas conhecidas de hepatopatias como: hepatites virais, Doença de Wilson, esteato hepatite não alcoólica e hepatite induzida por drogas ²⁸.

1.8 Classificação da HAI

A HAI pode ser classificada, com relação aos autoanticorpos circulantes, em dois perfis principais, ditos HAI tipo 1 e HAI tipo 2. Síndromes de sobreposição também podem ocorrer com a associação com colangite biliar primária em adultos ou colangite esclerosante em adultos e crianças.¹

O consenso de 2018 do Espghan ¹ propõe a realização de colangiografia no início da investigação para o diagnóstico diferencial entre colangite autoimune e HAI ²⁹. Estudo retrospectivo brasileiro de 2018⁵ mostrou que a colangiografia foi realizada por colangiopancreatografia endoscópica retrógrada e por colangioressonância magnética em pacientes que não respondiam a drogas imunossupressoras ou tinham níveis elevados de GGT durante o monitoramento da doença.

A HAI tipo1 representa 2/3 dos casos e caracteriza-se pela positividade para os autoanticorpos antinucleares (ANA) e/ou anticorpo anti músculo liso (anti-SMA) . Na HAI tipo 2 há positividade para o anticorpo anti microsomal fígado/rim tipo 1 (anti- LKM1) e/ou anticorpo anti citosol fígado tipo 1¹. A presença de títulos relevantes destes autoanticorpos pode não existir na faixa etária pediátrica da mesma forma que se observa entre os adultos¹.

1.9.Tratamento da HAI

1.9.1 Tratamento padrão

Excetuando-se os casos de apresentação fulminante com encefalopatia, os pacientes com HAI respondem bem ao tratamento imunossupressor com índices superiores a 90%³⁰. O último consenso publicado pela *ESPGHAN* e *NASPGHAN*¹ orienta como tratamento padrão o uso de corticosteroide (prednisolona ou prednisona) na dose de 2mg/kg/dia (máximo de 60mg), com redução gradual baseada no declínio das transaminases culminando com uma dose de manutenção de 2,5 a 5mg/dia. Na maioria dos pacientes, os níveis de transaminases declinam em até 80% nos dois primeiros meses de tratamento, porém a normalização completa pode demorar mais alguns meses. Durante essas primeiras seis a oito semanas, os níveis de transaminases devem ser avaliados semanalmente, assim como os efeitos sistêmicos do uso de corticoide em altas doses. A azatioprina deve ser combinada com a corticoterapia, porém o momento exato do início dessa medicação pode variar de acordo com os diferentes centros. Em alguns, sugere-se o uso de azatioprina na presença de sérios efeitos colaterais da corticoterapia sistêmica ou se os níveis de transaminases cessarem a queda com tratamento isolado de corticoide, devendo-se iniciar na dose de 0,5mg/kg/dia. Na ausência de sinais de toxicidade, a azatioprina pode ser prescrita no máximo até 2-2,5mg/kg/dia, até o controle bioquímico. Em outros locais, a azatioprina é iniciada na dose de 0,5 a 2 mg/kg/dia após algumas semanas de tratamento (geralmente duas) com corticoide em monoterapia. Seja qual for o protocolo, aproximadamente 85% dos pacientes necessitarão do uso da azatioprina. Em outros centros, advoga-se o uso combinado de azatioprina e corticoide desde o início do tratamento, porém com emprego de cautela devido a hepatotoxicidade da azatioprina, especialmente em pacientes com cirrose ou icterícia grave¹. Para pacientes com leucopenia (menos que 3.000 leucócitos) ou trombocitopenia (menos que 50.000 plaquetas) recomenda-se uso de prednisona em monoterapia e administração posterior de azatioprina apenas se houver melhora nos parâmetros hematológicos. Nos casos não responsivos, ou com recaídas frequentes, outros imunossupressores podem ser considerados, tais como ciclosporina, micofenolato, rituximabe, anti TNF-alfa e rapamicina, de acordo com a evolução clínica e laboratorial dos pacientes¹. Estudos em modelos animais tem proposto novas intervenções terapêuticas que talvez possam ser mais eficientes no controle da HAI,

tais como terapia alvo para células dendríticas^{31, 32}, Treg^{33, 34, 35}, vias de sinalização intracelular³⁶ e mesmo vias metabólicas celulares³⁷.

O uso de biomarcadores confiáveis e avaliação estruturada dos pacientes com HAI, antes e durante seu tratamento imunossupressor, é fundamental para instituição de novas modalidades terapêuticas. Potenciais candidatos a biomarcadores para HAI têm sido descritos na literatura (micro RNAs, proteínas e ligantes associados à morte celular programada, CD163 solúvel, fator ativador de células B)³⁸. Porém, estes potenciais biomarcadores não têm aplicação à prática diária. Soluções mais acessíveis, como a dosagem de CD4/CD8 e Treg^{13, 39}; demandam ainda estudos com coortes maiores e com acompanhamento longitudinal de longo prazo.

1.9.2 Indicação de tratamento

O tratamento da HAI deve ser instituído assim que realizado o diagnóstico, para evitar a progressão da doença. O objetivo do tratamento é reduzir ou eliminar a inflamação hepática, induzir a remissão, reduzir os sintomas e aumentar a expectativa de vida¹⁷.

O diagnóstico precoce da HAI permite instituição de terapia imunossupressora, e induz à remissão na grande maioria dos pacientes. Casos de hepatite autoimune grave e não tratada, por outro lado, têm prognóstico reservado^{1,24,40}.

1.9.3. Definições de resposta

1.9.3.1 Remissão

Define-se como remissão da doença o desaparecimento dos sintomas, normalização dos exames laboratoriais (AST ou ALT, bilirrubina e níveis de imunoglobulina G/IgG) e biópsia hepática sem alterações histológicas sugestivas de atividade inflamatória hepática³⁹. A realização da biópsia hepática antes do término do tratamento é o único método para assegurar a resolução completa da doença⁴¹.

Segundo estudos multicêntricos da Índia e Canadá, dos pacientes na faixa etária pediátrica, o tempo entre o início do tratamento e a remissão depende da gravidade da doença na apresentação^{42,43}. Em estudo mais recente, três critérios foram adicionados para definição de remissão: normalização dos níveis de IgG, negativação ou títulos muito baixos de autoanticorpos e resolução histológica da inflamação¹⁷.

1.9.3.2 Resposta ao tratamento

Define-se como resposta ao tratamento melhora clínica significativa associada a normalização dos níveis de ALT e AST, bilirrubinas e imunoglobulinas, ocorrida dentro de um ano e mantida por no mínimo seis meses em uso de terapia medicamentosa de manutenção; ou biópsia hepática realizada neste interim, demonstrando, no máximo, atividade inflamatória mínima. Ou ainda, a melhora clínica significativa associada com uma queda de no mínimo 50% nos valores de exames de perfil hepático durante o primeiro mês de tratamento e com os níveis ALT e AST em curva descendente até o alvo de duas vezes os valores de referência superiores dentro do período de seis meses de redução da terapia medicamentosa de manutenção; ou biópsia hepática dentro de um ano de tratamento, evidenciando somente atividade inflamatória mínima⁴.

Define-se recidiva da doença quando após resposta terapêutica ocorre aumento dos níveis de ALT ou AST maior que 2 vezes o valor de referência ou biópsia mostrando atividade da doença independentemente do reaparecimento ou não dos sintomas. Ou ainda quando ocorre ressurgimento dos sintomas com gravidade suficiente para requerer aumento da terapia imunossupressora (ou sua reintrodução, acompanhados de aumento de ALT ou AST, após uma resposta definida como completa.

A resposta histológica, no entanto, é mais tardia que a resposta bioquímica e a remissão clínica / bioquímica / imunológica nem sempre reflete a melhora histológica, ainda que 95% dos pacientes atinjam uma melhora significativa após 4 anos de tratamento efetivo⁴⁵.

1.9.4 Critérios de suspensão do tratamento

A recomendação atual é de no mínimo dois a três anos de tratamento medicamentoso e suspensão somente se os níveis de IgG estiverem normais e autoanticorpos negativos (ou títulos máximos de 1:20 para ANA/SMA) no último ano. Uma nova biópsia pode ser realizada antes da decisão da suspensão da medicação, se os exames de sangue estiverem normais¹.

2. OBJETIVOS

Avaliar o número de Treg em pacientes com HAI na faixa etária pediátrica em remissão clínica e laboratorial e comparar com o grupo controle.

3. PACIENTES E MÉTODOS

Estudo de coorte analítico descritivo, realizado com 27 crianças e adolescentes com histórico de HAI bem documentado e de longo prazo e de acordo com os critérios do Grupo Internacional de Estudo da HAI na época do diagnóstico. Todos os pacientes apresentaram início de sintomas na faixa etária pediátrica e estavam em tratamento imunossupressor. Foi realizado contato telefônico e por carta para todos os pacientes elegíveis para o estudo com sugestão de data para consulta e coleta de exames. Os que compareceram foram atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp, sob responsabilidade das Áreas de Gastroenterologia/Hepatologia e Alergia e Imunologia Pediátricas. Este grupo será chamado aqui de grupo caso. Também foram avaliados 28 indivíduos saudáveis, chamado aqui grupo controle. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas Unicamp parecer número 512.558 de 16/01/2014.

Este estudo faz parte de um grupo de pesquisa de avaliação imunológica da HAI e esta coorte já foi analisada em outros parâmetros em estudo anterior¹⁶.

Os pacientes foram acompanhados de 1993 a 2018, os dados clínicos foram retirados dos prontuários dos pacientes e do sistema informatizado de exames da Unicamp. A época do diagnóstico foi verificado o resultado dos seguintes exames: Imunoglobulina A (IgA); imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM), albumina, bilirrubina total e frações, razão de normatização internacional (RNI) , GGT, FALC, AST e ALT.

Na ocasião do diagnóstico foram dosados os autoanticorpos ANA, anti - SMA e anti - LKM1. As amostras de soro foram tituladas até 1/320. Os títulos > 1:40 e 1/20 foram considerados positivos para anti-SMA e anti-LKM1, respectivamente. De acordo, com o perfil de autoanticorpos encontrado, os pacientes foram classificados, quanto ao tipo de hepatite autoimune em tipo 1, tipo 2 ou indeterminado (quando autoanticorpos eram negativos) segundo critério do Grupo internacional de HAI.

Foram excluídos os diagnósticos de deficiência de alfa-1-antitripsina para todos os pacientes e de Doença de Wilson; além disso, foram excluídos também os pacientes com colangite esclerosante associada, pós-operatório de transplante hepático e outras doenças.

Foram considerados os exames coletados no pelo laboratório de análises clínicas da Unicamp.

Todos os indivíduos participantes deste estudo foram submetidos à coleta de amostra de sangue periférico para identificação de subtipos de linfócitos T, especialmente Treg, pelo método de citometria de fluxo, de acordo com o quadro 2 abaixo.

Quadro 2. Painel de marcadores de superfície para linfócitos T e T reguladores

Linfócitos	Expressão das moléculas
<i>Linfócitos T reguladores</i>	
TCD4+/TCD25+	CD4+ CD25+
TregFOX P3	CD4+ CD25+ FOxP3+
Treg FOX P3 CD39+	CD4+ CD25+ FOxP3+ CD39+

A terapia imunossupressora instituída para o grupo caso constituiu-se da combinação de prednisona (1-1,5mg/kg/dia, máximo de 60mg/dia) e azatioprina (1-1,5mg/kg/dia). A dose de prednisona foi reduzida em cada retorno ambulatorial, até que a dose de manutenção de 2,5-5 mg foi atingida, ao mesmo tempo em que estavam mantidos estáveis os parâmetros clínicos e laboratoriais. A resposta ao tratamento foi definida de acordo com os critérios do Grupo Internacional de Estudo da HAI ¹.

O grupo controle foi composto por indivíduos maiores de 18 anos, estudantes de pós-graduação e submetidos à anamnese estruturada por médica da área de Gastroenterologia Pediátrica. Todos os indivíduos se auto declararam saudáveis, negaram uso crônico de tabaco, álcool ou qualquer tipo de drogas e negaram ser portadores de doenças crônicas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os pacientes ou seus responsáveis quando menores de 18 anos e por todos os membros do grupo controle.

3.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular, que permite analisar várias características de forma rápida e multiparamétrica. Pode-se avaliar: tamanho relativo da célula (FSC- Forward Scatter), granulosidade e complexidade celular (SSC- Sider Scatter). Três sistemas compõem o citômetro de fluxo: sistema fluído que

introduz e alinha as partículas em suspensão para análise; sistema óptico (laser/fonte de luz) que gera e coleta os sinais de luz pelos detectores apropriados – tubos fotomultiplicadores (excitação e emissão) e sistema eletrônico que converte dos sinais ópticos em sinais eletrônicos para análise em computador. Neste estudo, a citometria de fluxo foi utilizada para análise dos subtipos de linfócitos T, especialmente T regulatórias.

3.2 Imunofenotipagem de células mononucleares do sangue periférico

Foram analisadas as subpopulações linfocitárias através de marcadores de superfície CD45 (linfócitos totais), CD3 (linfócitos T), CD4 (linfócitos T helper), CD8 (Linfócitos T citotóxicos), CD25 (presente nos linfócitos TCD4; linfócitos T regulatórios) e CD39 (presente nos linfócitos TCD4/CD25/FOXP3). Para esta análise das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico, 100 µl de sangue total coletados em tubo com EDTA K3 líquido (Vacuette®, Brasil) dos pacientes e indivíduos controles foram incubados com anticorpos monoclonais para os diferentes marcadores de superfície, conforme o quadro 3.

Quadro 3. *Painel de anticorpos de marcação de superfície.*

Anticorpo (Clone)	Fluorescência	Marca
Anti-CD45 HI30	PercP	BD
Anti-CD3 (UCHT1)	V500	BD
Anti-CD4 (RPA-T4)	V450	BD
Anti-CD8 RPA-T8	BB515	BD
Anti-CD25 2A3	BB515	BD
Anti-CD39 TU66	PE	BD

Onde: V500/450 (Violet), BB (Brilhant Blue), PercP (Proteína Peridinina-Clorofila), , PE (Ficoetrina)

Após 20 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 2 ml de solução de lise de eritrócitos (FACS lising BD®) seguido por incubação por 10 minutos ao abrigo de luz. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, lavadas por duas

vezes com 2ml de PBS e ressuspensas em 400ul de PBS para leitura no citômetro. Após a marcação dos anticorpos para CD4, CD25 e CD39, as células foram então lavadas, fixadas e ressuspensas em tampão de permeabilização para Foxp3, seguindo recomendações do fabricante, seguidamente incubadas com Anti-Foxp3 Alexa Fluor 647® (Clone 259D/C7- BD Biosciences®, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após, adicionado 2 ml de PBS e uma centrifugação a 1500 rpm as células foram ressuspensas em 400uL de PBS para leitura no citômetro. Foram adquiridos 50.000 eventos em citômetro de fluxo FACSCanto® (BD Biosciences, EUA), analisados posteriormente no programa computacional FACSDiva® (BD Biosciences, EUA) usando as estratégias para as devidas populações estudadas.

3.3 Análise estatística dos resultados

Para análise da população de células, os resultados foram exibidos em porcentagem e comparados a população total de linfócitos. Para cada subpopulação de células estudadas foram utilizados valores das medianas e extremos (mínimo e máximo). Foram utilizados métodos não paramétricos de análise já que a maior parte das variáveis não corresponderem ao padrão de normalidade. As análises estatísticas entre os dois grupos analisados foram realizadas através do programa SPSS® software para Windows, versão 17.0.0. (SPSS Inc, EUA) utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os gráficos de citometria de fluxo foram feitos no Software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, EUA).

Os resultados em porcentagem obtidos para cada população de células, foram comparados ao número total de células mononucleares do sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo. Foram utilizados valores mínimo, médio e máximo para cada subpopulação. As análises estatísticas entre os dois grupos analisados foram realizadas através do programa SPSS® software para Windows, versão 17.0.0. (SPSS Inc, EUA) utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os gráficos de citometria de fluxo foram feitos no Software GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS

Foram avaliados 27 pacientes com HAI (grupo caso), diagnosticados na infância e 28 indivíduos saudáveis (grupo controle). As características clínicas e epidemiológicas relativas ao momento do diagnóstico de HAI estão expressas nas Tabelas 2 e 3. A análise comparativa de alguns destes critérios foi realizada para o grupo todo em relação aos controles, como pode ser visto na Tabela 7. Não foi possível realizar testes estatísticos para comparação dos grupos tipo de HAI, em consequência do pequeno número de indivíduos em cada grupo. Os resultados destas análises mostraram, para as características clínicas do grupo caso, predominância do sexo feminino, mediana de idade ao diagnóstico de 11,3 anos e maior número de indivíduos com HAI tipo1.

Tabela 2: Características epidemiológicas e clínicas dos grupos caso e controle no momento do diagnóstico. Adaptado de Santos IP ⁽¹⁶⁾.

Caraterística	Grupo Caso (n: 27)	Grupo Controle (n:28)	P
Sexo	F: 25	F: 22	0,25
	M: 2	M: 6	
Idade ao diagnóstico	11,3 anos	-	NA
Mediana Mínima e máxima	1,5 – 15,3 anos		
Tipo HAI	Tipo 1: 19	-	NA
	17 F; 2 M		
	Tipo 2: 4		
	4 F; 0 M		
	Indeterminado: 4		
	4 F; 0 M		

Onde: F: feminino; M; masculino; ND: não determinado. NA: Não se aplica

Tabela 3: Auto anticorpos pesquisados para HA no grupo caso, no momento do diagnóstico.

Grupo	n	FAN/ANA	Anti Musculo Liso/SMA	Anti LKM1
<i>HAI tipo1</i>	19	18	7	0
<i>HAI tipo 2</i>	4	0	0	4
<i>HAI ND</i>	4	0	0	0

Onde FAN: Fator Anti nuclear ou ANA: antinuclear antibody; SMA: anti smooth muscle antibody; anti LKM1: anti liver kidney microsome type 1 antibody.

No momento deste estudo, os pacientes já em acompanhamento há vários anos e em uso de terapia imunossupressora, foram submetidos à coleta do exame imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos, pelo método de citometria de fluxo. Suas características ao momento da coleta da imunofenotipagem estão expressas na Tabela 4. A análise destes dados mostrou predominância do sexo feminino e de HAI tipo 1, com mediana de idade de 15,9 anos. Dos 27 pacientes, 23 apresentaram boa resposta ao tratamento. Outros quatro pacientes tiveram a seguinte evolução: um apresentou boa resposta inicial, porém teve má adesão no momento da coleta; um já iniciou tratamento em estágio avançado de cirrose hepática e por isso não foi possível avaliar queda de transaminases; e dois apresentaram recidiva.

Tabela 4: Características epidemiológicas e clínicas do grupo caso no momento da coleta de imunofenotipagem de linfócitos

Caraterística	Grupo Caso (n: 27)
Sexo	F: 25
	M: 2
Idade no momento do estudo Mediana, mínima e máxima	15,9 anos
	3,1 - 35,9 anos
	1,5 - 15,3 anos
Tipo HAI	Tipo 1: 19/27
	Tipo 2: 4/27
	Indeterminado: 4/27
Resposta ao tratamento	Completa: 23
	Recidiva: 2
	Nula: 0
	Má adesão: 1
	Não determinado: 1
Tempo de uso imunossupressor Mediana, mínima e máxima	6,5 anos
	0,5 – 22,8 anos

Quanto à comparação da proporção dos subtipos de linfócitos T no grupo caso e no grupo controle, observou-se diferença quanto ao subtipo TCD3/CD8 (maior no grupo caso); este achado já foi discutido em outro trabalho do mesmo grupo (¹⁶) e não será motivos de discussão no presente estudo. No que se refere às células T regulatórias, nas subpopulações estudadas (TCD4/CD25, TCD4/CD25/FOXP3 e TCD4/CD25/FOXP3/CD39) não foram observadas diferenças entre os grupos caso e controle) (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de subtipos de Linfócitos T por exame de citometria de fluxo dos grupos caso e controle. Porcentagem em relação ao número total de mononucleares no sangue periférico. Adaptado de Santos, IP ⁽¹⁶⁾.

Grupo/Célula (%)	Casos	Controles	*p
<i>Linfócitos T</i>			
<i>TCD3</i>	76,6 (58,00-96,90)	73,55 (58,40-89,50)	0,52
<i>TCD3/CD4</i>	54,35 (39,10-77,10)	57,35 (40,00-68,60)	0,37
<i>TCD3/CD8</i>	32,10 (21,60-53,00)	28,60 (20,10-37,90)	0,009
<i>Linfócitos T regulatórios</i>			
<i>TCD4/TCD25</i>	7,40 (1,70-13,5)	7,25 (1,60-18,3)	0,90
<i>TCD4/CD25/FOXP3)</i>	0,80 (0,2-4,8)	1,15 (0,10-2,20)	0,12
<i>TCD4/CD25/FoxP3/CD39</i>	19,16 (6,90-66,90)	27,15 (6,40-50,90)	0,15

O valor superior corresponde à mediana em relação ao número total de mononucleares no sangue periférico. Os valores entre parênteses correspondem aos valores mínimos e máximos; p*: p valor teste de Mann- Whitney

5. DISCUSSÃO

No que se refere a análise da proporção de subtipos de linfócitos T no grupo de pacientes com HAI, o presente estudo não encontrou diferença para as células T regulatórias (TCD4/CD25, TCD4/CD25/FOXP3 e TCD4/CD25/FOXP3/CD39) entre os grupos caso e controle, assim como já descrito na literatura em adultos⁴⁶.

Defeitos numéricos e funcionais de Treg já foram descritos em pacientes com HAI em diferentes momentos da evolução da doença (^{11, 47}). Pela avaliação das porcentagens de Treg e outros linfócitos T, antes e durante a terapia para HAI em pacientes pediátricos, Diestelhorst *et al*⁴⁷ encontraram que os pacientes não tratados apresentavam um grande número de Tregs intra-hepáticas, e pouca infiltração de outras células T. Durante o tratamento para HAI, nestes mesmos pacientes, houve diminuição no número de todas estas células intra-hepáticas, especialmente das Treg⁴⁶. Em outro estudo com pacientes pediátricos com HAI, Behayri⁴⁸ et al, 2016, encontraram número aumentado de Treg e relação direta com a quantidade de células inflamatórias na biópsia hepática de 50 pacientes pediátricos, no momento do diagnóstico. Peiseler⁴⁶ et al encontraram que a frequência de células Treg no sangue de pacientes com HAI foi significamente maior em pacientes com doença ativa do que naqueles em estado de remissão, sugerindo que a frequência de Treg pode aumentar com o grau de inflamação. Porém, Longhi *et al*¹¹, em outro estudo, em amostras de sangue periférico, encontraram que células Treg CD4/CD25 e CD4/CD25/FOXP3 apresentavam defeitos numéricos e funcionais pacientes diagnosticados com HAI, em diferentes momentos. Os autores encontraram também apoptose deficiente de CD4/CD25 nestes pacientes, o que pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento da resposta autoimune¹¹. Concordando com Longhi et al¹¹, Liberal et al⁹ observaram que Tregs isoladas do sangue periférico de pacientes com HAI falham em conter a produção de células efectoras T CD4 e CD8 e em interagir com células do sistema imune inato. Observaram também baixos níveis de Tregs CD4/CD25/FOXP3/CD39, que se mostraram também instáveis. CD39 é uma molécula proteica presente em Linfócitos T e B; sua atividade enzimática está relacionada à reação ATP/ADP/AMP/ Adenosina. A adenosina é considerada como fator anti-inflamatório. Defeitos em CD39 e consequente menor produção de adenosina têm sido associadas à vários cenários de inflamação (doenças auto imunes, tumores, aterosclerose e infecções, como a causada pelo vírus HIV)⁴⁹.

Outro ponto que dificulta a avaliação das Tregs é a sua constante oscilação numérica no sangue periférico, uma vez que há Treg naturais (provenientes do timo) e Tregs induzidas na periferia, a partir de Linfócitos Th0, pela presença de diferentes estímulos⁹. Até o momento, a avaliação numérica das Tregs em indivíduos doentes se faz em comparação com número de Tregs de indivíduos saudáveis, e não por comparação com tabelas de valores normais por faixa etária, como ocorre com outras subpopulações linfocitárias.

Há poucos estudos *in vivo* avaliando o efeito do tratamento imunossupressor na HAI. Ferri *et al*¹³ avaliando pacientes brasileiros com doença hepática autoimune, em regime de imunossupressão e considerados com boa resposta ao tratamento, concluíram que estes pacientes ainda mostraram sinais de atividade inflamatória a nível celular, quanto à diferentes subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD14.

Taubert *et al*⁵⁰ (2014) avaliaram biopsias hepáticas e amostras de sangue de pacientes adultos com HAI tipo 1, ao diagnóstico e sob terapia imunossupressora, quanto a presença de linfócitos T e Treg. Encontram que, no fígado, ao diagnóstico, havia grande número de Treg e que estas células diminuíram com o tratamento; no sangue, o número das Treg se mostrou semelhante ao diagnóstico e sob imunossupressão.

Renand⁵¹ *et al* (2018) avaliaram 14 pacientes com HAI ao diagnóstico, 11 sob tratamento imunossupressor e 14 controles saudáveis. Os autores estudaram 37 diferentes subtipos de linfócitos no sangue periférico e biópsias hepáticas dos pacientes HAI. Encontraram, como resultados significativos, que no sangue periférico, ao diagnóstico, os pacientes apresentavam células TCD4 e NK diminuídas e células TCD8 aumentadas. Com a imunossupressão, não houve mudança destes padrões. Quanto às biópsias hepáticas, ao diagnóstico, havia aumento de TCD4, Tregs e TCD8; após o tratamento imunossupressor, observou-se certa diminuição, mas não ausência, destas células no tecido hepático. Estes achados, segundo os autores, podem explicar o alto risco de recidiva quando da suspensão dos imunossupressores na HAI.

Assim, os resultados do presente estudo devem ser analisados levando-se em conta a idade dos pacientes (início da doença na faixa etária pediátrica), o momento da avaliação dos subtipos de linfócitos (tratamento imunossupressor de longa duração) e o local da avaliação das células imunes (sangue).

6. CONCLUSÕES

Como a maior parte dos pacientes desse estudo demonstrou boa resposta ao tratamento imunossupressor, é provável que o fato de não termos encontrado diferenças entre a porcentagem de Tregs no grupo caso e controle seja devido a atividade inflamatória reduzida ou mesmo ausente, ou seja, pacientes pediátricos com HAI em terapia imunossupressora que apresentem Treg em número normal provavelmente tem baixa/nenhuma inflamação e pode ser um promissor biomarcador da avaliação de remissão da doença.

7. REFERÊNCIAS

1. Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U, Czubkowski P, Debray D, Dezsofi A et al. Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease: ESPGHAN Hepatology Committee Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018 ; 66(2):345-60.
2. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18:998
3. Cançado ELR, Porta G. Autoimmune hepatitis in South America. In: Manns MP, Paumgartner G, Leuschner U. *Immunology and liver.* Falk foundation 114. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher 2000
4. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;31(5):929-38.
5. Porta G, Carvalho E, Santos JL, Gama J, Borges CV, Seixas RB et al. Autoimmune hepatitis in 828 Brazilian children and adolescents: clinical and laboratory findings, histological profile, treatments, and outcomes. *J Pediatr (Rio J).* 2018.
6. Makol Ashima, Watt Kymberly D e Chowdhary Vaidehi R. Autoimmune hepatitis: a review of current diagnosis and treatment Hindawi Publishing corporation Hepatitis Research and treatment Volume 2011, article ID390916, 11 pages
7. Heneghan M.A, Yeoman A.D, Verma S, Smith A.D, Longhi M.S Autoimmune hepatitis *Lancet* 2013; 382:1433-44
8. Aizawa Y & Hokari A. Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects. *Clin Exp Gastroenterol.* 2017; (19) 10:9-18.
9. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life.* 2015 Feb;67(2):88-97

10. Wang J, Cao X, Zhao J, Zhao H, Wei J, Li Q et al. Critical roles of conventional dendritic cells in promoting T cell-dependent hepatitis through regulating natural killer T cells Clin Exp Immunol. 2017; 188(1):127-37.
11. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D et al. Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. J Immunol 2006; 176:4484–91.
12. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25) Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 155, 1151–1164.
13. Ferri PM, Simões E Silva AC, Torres KCL, Silva SLC, Aquino DJQ, Ferreira MLM et al.
Autoimmune Hepatitis and Autoimmune Hepatitis Overlap With Sclerosing Cholangitis: Immunophenotype Markers in Children and Adolescents. J Ped Gastroenterol Nutr . 2018. 66(2):204-11.
14. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC et al. Clinical distinctions and pathogenic implications of type I autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. J Hepatol 2002;37:302–8.
15. Li Y, Peng M, Gong G. Evaluation of the revised versus the simplified scoring system in patients with autoimmune hepatitis. Exp Ther Med. 2014; 7(1):131-6.
16. Santos I.P. Análise das células dendríticas plasmocitárias e subtipos de linfócitos em pacientes com hepatite autoimune sob tratamento imunossupressor Dissertação de Mestrado. Pós Graduação Saúde da Criança e do Adolescente. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas/Unicamp. Julho 2018.

17. Mielo-Vergani G, Heller S, Jara P, et al. Autoimmune hepatitis . J pediatr gastroenterol Nutr 2009;49:158-64
18. Sebode 2018 – Sebode M, Weiler – Normann Christina, Liwinski Timur , Schramm Christoph. Autoantibodies in autoimmune liver disease – clinical and diagnostic relevance. Dellavance A. et al
19. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2, controle de qualidade e associações clínicas. Rev Bras Reumatol 2009;49(2):89-109
20. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, Nishioka M, Penner E. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. J Hepatol 2004; 41: 677-683
21. Guindi M: Histology of autoimmune hepatitis and its variants. Clin Liver Dis 2010;14:577-590.
22. Schiano TD, Fiel MI: To biopsy or not to biopsy. Clin Gastroenterol Hepatol 2011;9:3-4.
23. Washington MK, Manns MP: Autoimmune hepatitis; in Burt AD, Portmann B, Ferrell L (eds): MacSween's Pathology of the Liver. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2012, pp 467-490.
24. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. 2008 Jul;48(1):169-76.
25. Balitzer D, Shafizadeh N, Peters MG, Ferrell LD, Alshak N, Kakar S. Autoimmune hepatitis: review of histologic features included in the simplified criteria proposed by

- the international autoimmune hepatitis group and proposal for new histologic criteria. *Mod Pathol.* 2017; 30(5):773-83.
26. Bellomo-Brandão MA, Costa-Pinto EA, De Tommaso AM, Hessel G. Clinical and biochemical features of autoimmune hepatitis in 36 pediatric patients. *Arq Gastroenterol.* 2006;43(1):45-9.
 27. Cjaza AJ Factoring the intestinal microbiome into the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2016; 14; 22 (42): 9257-78.
 28. de Boer YS, van Nieuwkerk CM, Witte BI, Mulder CJ, Bouma G, Bloemena E. Assessment of the histopathological key features in autoimmune hepatitis. 2015; 66(3):351-62.
 29. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis: Standard treatment and systematic review of alternative treatments. *World J Gastroenterol* 2017; 23(33): 6030-6048
 30. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20 year experience. *Hepatology* 1997;25:541-7
 31. Wang Q, He H, Chen D, Wang C, Xu Y, Song W. Hepatic stroma-educated regulatory DCs suppress CD8⁺ Oncotarget. 2017; 13;8(55):93414-25.
 32. Xiang M, Liu T, Tan W, Ren H, Li H, Liu J et al. Effects of kinsenoside, a potential immunosuppressive drug for autoimmune hepatitis, on dendritic cells/CD8⁺ T cells communication in mice. *Hepatology.* 2016;64(6):2135-50.
 33. Jeffery HC, Braitch MK, Brown S, Oo YH. Clinical Potential of Regulatory T Cell therapy in liver diseases: An Overview and Current Perspectives. *Front Immunol.* 2016; 6; 7:334.
 34. Yuksel M, Xiao X, Tai N, Vijay GM, Gülden E, Beland K et al. The induction of autoimmune hepatitis in the human leucocyte antigen-DR4 non-obese diabetic mice autoimmune hepatitis mouse model. *Clin Exp Immunol.* 2016;186(2):164-76.

35. Webb G, Chen YY, Li KK, Neil D, Oo YH, Richter A et al. Single-gene association between GATA-2 and autoimmune hepatitis: A novel genetic insight highlighting immunologic pathways to disease. *J Hepatol*. 2016;64(5):1190-3.
36. Chen X, Zhang Z, Bi Y, Fu Z, Gong P, Li Y et al. mTOR signaling disruption from myeloid-derived suppressive cells protects against immune-mediated hepatic injury through the HIF1 α –dependent glycolytic pathway. *J Leukoc Biol*. 2016; 100(6): 1349-62.
37. Yang Q, Wang J, Liu R, Wang Z, Li Y, Zhang Y et al. Amelioration of concanavalin A-induced autoimmune hepatitis by magnesium isoglycyrrhizinate through inhibition of CD4(+)CD25(-)CD69(+) subset proliferation. *Drug Des Devel Ther*. 2016; 25;10:443-53.
38. Czaja AJ. Emerging therapeutic biomarkers of autoimmune hepatitis and their impact on current and future management. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 20:1-18.
39. Grant CR & Liberal L. Liver immunology: How to reconcile tolerance with autoimmunity. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017; 41(1): 6-16.
40. Lohse AW. Diagnostic Criteria for Autoimmune Hepatitis: Scores and More. *Dig Dis*. 2015;33 Suppl 2:47-52.
41. Michael P. Manns,¹ Albert J. Czaja,² James D. Gorham,³ Edward L. Krawitt,⁴ Giordina Mieli-Vergani,⁵ Diego Vergani,⁶ and John M. Vierling Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis AASLD PRACTICE GUIDELINES
42. Amarapurkar D, Dharod M, Amarapurkar A. Autoimmune hepatitis in India: single tertiary referral centre experience. *Trop Gastroenterol* 2015;36:36-45

43. Jimenez-Rivera C, Ling SC, Ahmed N, et al. Incidence and characteristics of autoimmune hepatitis. *Pediatrics* 2015;136:136:e1237-48
44. Tiniakos D.G.^{a,c} · Brain J.G.^{a, b} · Bury Y.A. Role of Histopathology in Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis* 2015;33(suppl 2):53-64
45. Ferreira AR, Roquete ML, Toppa NH, et al. Effect of treatment of hepatic histopathology in children and adolescents with autoimmune hepatitis. *J pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:65-70
46. Diestelhorst J, Junge N, Schlue J, Falk CS, Manns MP, Baumann U et al. Pediatric autoimmune hepatitis shows a disproportionate decline of regulatory T cells in the liver and of IL-2 in the blood of patients undergoing therapy. *PLoS One*. 2017; 11;12(7):e0181107.
47. Behairy BE¹, El-Araby HA¹, Abd El Kader HH², Ehsan NA³, Salem ME¹, Zakaria HM⁴, Khedr MA¹. Assessment of intrahepatic regulatory T cells in children with autoimmune hepatitis. *Ann Hepatol*. 2016 Sep-Oct;15(5):682-90. doi: 10.5604/16652681.1212319.
48. Peiseler M¹, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, Baron U, Olek S, Wiegand C, Lohse AW, Weiler-Normann C, Schramm C, *J Hepatol*. 2012 FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *Jul*;57(1):125-32. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.029. Epub 2012 Mar 14.
49. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013;19(6):355-67.
50. Taubert R¹, Hardtke-Wolenski M¹, Noyan F¹, Wilms A¹, Baumann AK¹, Schlue J², Olek S³, Falk CS⁴, Manns MP¹, Jaeckel E⁵ Intrahepatic regulatory T cells

in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *J Hepatol.* 2014 Nov;61(5):1106-14. doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.034. Epub 2014 Jun 2.

51. Renand A^{1,2}, Habes S^{1,2,3}, Mosnier JF^{1,4}, Aublé H⁵, Judor JP^{1,2}, Vince N^{1,2}, Hulin P⁶, Nedellec S⁶, Métairie S⁷, Archambeaud I^{3,8}, Brouard S^{1,2}, Gournay J^{3,8}, Conchon S^{1,2}. Immune Alterations in Patients With Type 1 Autoimmune Hepatitis Persist Upon Standard Immunosuppressive Treatment. *Hepatol Commun.* 2018 Aug 6;2(8):968-981. doi: 10.1002/hep4.1202. eCollection 2018 Aug.

8. ANEXOS

Tabela 6. Tabela para cálculo de escore diagnóstico HAI-1999

Parâmetros	Escore
ALT/AST (número de X acima do normal)	
Menor que 1.5	+2
1,5-3	0
Maior que 3	-2
Globulinas, gamaglobulinas ou IgG	
Maior que 2	+3
1.5-2	+2
1-1,5	+1
Menor que 1	0
Autoanticorpos :FAN, AML,ANTI-LKM1	
Menor que 1/80	+3
1/80	+2
1/40	0
Antimitocôndria	-4
Marcadores virais	
Anti-VHA IgM, AgHBs ou anti-HBc IgM+	-3
Anti-VHC e RNA do VHC +	-3
Anti-VHA IgM, AgHBs, anti-HBc IgM ou anti-VHC -	+3
Outra doença autoimune no paciente ou familiar de primeiro grau	+2
História de uso recente de drogas hepatotóxicas positiva/negativa	
Histologia	
Hepatite de interface	+3
Rosetas	+1
Infiltrado inflamatório com predomínio de plasmócitos	+1
Nenhuma das alterações acima	-5
Alterações biliares sugestivas de CEP	-3
Resposta terapêutica	
Completa/recidiva durante ou depois da retirada do tratamento	+2/+3
Diagnóstico definitivo	
Antes do tratamento	Maior que 15
Após o tratamento	Maior que 17
Diagnóstico provável	
Antes do tratamento	10-15
Após o tratamento	12-17

Tabela 7. Tabela para cálculo de escore diagnóstico HAI-2008

Variável	Resultado	Pontuação
ANA ou SMA	Maior que 1/40	1
	Maior que 1/80	2
LKM	Maior que 1/40	2
SLA	Positivo	2
IgG	Maior que limite superior da normalidade	1
	Maior que 1.1x o limite superior da normalidade	2
Histologia hepática	Compatível com HAI (achados histológicos de hepatite crônica com infl linfocitário sem todos os achados típicos)	1
	Típica de HAI (achados histológicos simultâneos de hepatite de interface, infiltrado portal linfocitário/linfoplasmocitário com extensão para lóbulo, empiroplese e rosetas)	2
Hepatite viral	Ausente	2

Interpretação:

Diagnóstico provável: 6

Diagnóstico definitivo: Maior que 7